

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/15217
G01N 33/68, C07K 15/00, C12P 21/08		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Juli 1994 (07.07.94)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/03661	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. December 1993 (22.12.93)	
(30) Prioritätsdaten: P 42 43 648.6 23. December 1992 (23.12.92) DE	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).	
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LILL, Helmut [DE/DE]; Blumenstrasse 15A, D-82408 Wielenbach (DE). DONIÉ, Frédéric [DE/DE]; In der Au 10, D-82377 Penzberg (DE). BORGYA, Anneliese [DE/DE]; Beiselstrasse 18, D-82327 Tutzing (DE). SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Ammerstrasse 39, D-82362 Weilheim (DE).	
(74) Anwälte: JUNG, Michael usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).	

(54) Title: PROCESS FOR DETECTING HEART MUSCLE NECROSSES USING ANTIBODIES AGAINST N-TERMINAL TROPONIN I-PEPTIDE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON HERZMUSKELNEKROSEN MITTELS ANTIKÖRPER GEGEN DAS N-TERMINALE TROPONIN I-PEPTID

(57) Abstract

In a process for the immunological detection of heart muscle necroses a blood sample is allowed to react with at least one antibody which recognizes the N-terminal peptide of cardiac troponine I and can be obtained by immunization with an immunogen containing the amino acid sequence SEQ ID NO 1 or partial sequences thereof at least 6 amino acids in length, the polyclonal or monoclonal antibody being extracted by known methods from the serum or from the immortalized and cloned spleen cells of the immunized animals. The complex which then forms is detected in the appropriate way.

(57) Zusammenfassung

In einem Verfahren zur immunologischen Bestimmung von Herzmuskelnekrosen wird eine Probe mit mindestens einem Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilesequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und Isolierung des polyclonalen oder monoklonalen Antikörpers aus dem Serum beziehungsweise den immortalisierten und klonierten Milzziellen der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren, versetzt und der sich bildende Komplex in geeigneter Weise nachgewiesen.



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 42 43 648 A 1

⑥ Int. Cl. 5:
C 07 K 15/28
G 01 N 33/53
C 12 N 5/16
// C12N 5/18, C12Q
1/28

⑪ Aktenzeichen: P 42 43 648.6
⑫ Anmeldetag: 23. 12. 92
⑬ Offenlegungstag: 7. 7. 94

DE 42 43 648 A 1

⑪ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑫ Erfinder:

Lill, Helmut, Dipl.-Chem. Dr., 82407 Wielenbach, DE;
Doniè, Frédéric, Dipl.-Biochem. Dr., 82377
Penzberg, DE; Borgya, Anneliese, Dipl.-Biol., 82327
Tutting, DE; Seidel, Christoph, Dr., 82362 Weilheim,
DE

⑭ Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen mittels Antikörper gegen das N-terminale Troponin I-Peptid

⑮ In einem Verfahren zur Immunologischen Bestimmung von Herzmuskelnekrosen wird eine Probe mit mindestens einem Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilesequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und Isolierung des polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers aus dem Serum beziehungsweise den immortalisierten und klonierten Milzzellen der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren, versetzt und der sich bildende Komplex in geeigneter Weise nachgewiesen.

DE 42 43 648 A 1

DE 42 43 648 A1

Beschreibung

5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen mittels Antikörper gegen das N-terminale Troponin I-Peptid, bei dem man eine Blutprobe mit einem Antikörper gegen das N-terminale Tr p nin I-Peptid versetzt und den sich bildenden K mplex nachweist sowie die in diesem Verfahren verwendeten Antikörper und ein Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper.

10 Die Myofibrillen des quergestreiften Muskels bestehen aus zwei zusammenwirkenden Proteinfilamenten, den dicken Filamenten mit Myosin als Hauptbestandteil und den dünnen Filamenten, die Actin, Tropomyosin und Troponine enthalten. Troponin ist in den Zellen als regulatives Strukturprotein zu einem Komplex zusammenge-
lagert und besteht aus drei verschiedenen Proteinen:

Troponin C : bindet Calciumionen
Troponin I : eine Actin-bindende Untereinheit
Troponin T : lagert sich an Tropomyosin an.

15 Die vergleichbare Nomenklatur hat historische Gründe, da ursprünglich der Komplex als solcher gereinigt und als ein Protein angesehen und mit Troponin benannt wurde.

Von Troponin I sind drei Isoformen bekannt entsprechend ihrem Auftreten im Herzmuskel (TnIc), langsamen Skelettmuskeln (TnIs) und schnellen Skelettmuskeln (TnIf). Kardiales Troponin I unterscheidet sich von skelettmäßigem Troponin I hauptsächlich durch eine zusätzliche N-terminale Sequenz aus 30 Aminosäuren.

20 Kardiales Troponin I wird nach einem akuten Myokardinfarkt freigesetzt und kann im Blutplasma nachgewiesen werden. Es stellt somit einen Marker für Herzmuskelzellnekrosen dar. Cummins, J. Mol. Cell. Card. 19 (1987), 999–1010 und Cummins und Cummins, Clin. Invest. 113 (1987), 1333–1344 konnten nachweisen, daß TnIc im Serum normalerweise in Konzentrationen in der Höhe von 10 ng/ml auftritt. Es zeigte sich, daß beim transmuralen Infarkt eine erhöhte Serumkonzentration zu beobachten ist. TnIc war von der 4. bis 168. Stunde nach Schmerzbeginn bei 37 Patienten mit akutem transmuralen Infarkt erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden im Tiermodell erhalten. Danach ergibt sich als Zeitintervall für die absolute diagnostische Sensitivität für TnIc die 10–50. Stunde nach dem Infarktereignis.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es ein Bestimmungsverfahren zu entwickeln, das geeignet ist einen akuten Myokardinfarkt möglichst schnell innerhalb der ersten Stunden nach dem Infarktereignis nachzuweisen.

Gelöst wurde die Aufgabe durch die in den Ansprüchen näher charakterisierte Erfindung. Insbesondere durch ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung von Herzmuskelnekrosen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe mit mindestens einem Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und Isolierung des polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers aus dem Serum bzw. den immortalisierten und klonierten Milzellen der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren, versetzt und den sich bildenden Komplex in geeigneter Weise nachweist.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren sowie ein monoklonaler Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, Immortalisierung der Milzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren und Isolierung des Antikörpers aus den klonierten Zellen nach bekannten Verfahren.

35 Die Durchführung des immunologischen Bestimmungsverfahrens von Herzmuskelnekrosen erfolgt mit dem Fachmann geläufigen Methoden. Beispielsweise kann die Bestimmung in Proben, das heißt Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Blut, Plasma oder Serum, durch einen Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay oder durch Immunfluoreszenz erfolgen. Als Verfahrensvariante sind alle bekannten Verfahren wie kompetitive Immunoassays, Sandwich-Immunoassays und IEAMA-Verfahren oder homogene Immunoassays wie CEDIA® anwendbar. Es ist möglich den Test in Form eines Naßtestes oder Trockentestes durchzuführen.

40 Bei den heterogenen Verfahren wird der TnIc-spezifische Antikörper an eine Festphase immobilisiert. Die Immobilisierung kann adsorptiv, kovalent oder über ein spezifisches Bindepaar wie Biotin/ Streptavidin, Antikörper/Antigen oder Zucker/Lectin erfolgen. Dabei wird der erfindungsgemäße TnIcspezifische Antikörper an einen dieser Bindepartner gebunden. Der andere Bindepartner ist an die Festphase gebunden. Methoden zur adsorptiven oder kovalenten Kopplung sind dem Fachmann bekannt.

45 Als Festphase bei einem Naßtest können Materialien verwendet werden, wie z. B. Röhrchen (tubes), Kunststoffküvetten, Mikrotiterplatten, Kugeln oder Mikrocarrier aus Kunststoffen wie Polystyrol, Vinylpolymeren, Polypropylen, Polycarbonat, Polysacchariden, Silikone, Gummi oder behandeltes Glas (vgl. beispielsweise E.T. Maggio, Enzyme Immunoassays, CAC. Press, Florida (1980), insbesondere Seiten 175–178, EP-A-0 063 064, Bioengineering 16 (1974), 997–1003, C.J. Senderson und D.V. Wilson, Immunology 20 (1971), 1061–1065). Insbesondere wird als Festphase ein mit Avidin der Streptavidin beschichtetes Trägermaterial, insbesondere Polystyrol, vorzugsweise hergestellt wie in EP-A-0 269 092 beschrieben, verwendet. Als Festphase bei einem Trockentest sind die hierbei üblichen Vliese wie Cellulose- oder Glasfaservliese als auch Membranen zu verwenden.

50 Besonders zweckmäßig hat sich der Sandwich-Test erwiesen. Hierbei wird ein immobilisierter Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt, in Kombination mit einem zweiten TnIc-spezifischen

DE 42 43 648 A1

Antikörper, an den eine bestimmbar Gruppe gekoppelt ist, eingesetzt. Als bestimmbar Gruppe können alle gängigen Markierungsgruppen wie Enzyme oder fluoreszierende oder lumineszierende Reste eingesetzt werden. Der zweite Antikörper, der ebenfalls das N-terminale Peptid von Tnlc erkennt, wird so ausgewählt, daß er nicht oder nur unwesentlich die Bindung des ersten Antikörpers an diesem Peptid stört. Beide Antikörper sind also gegen verschiedene Epitope am N-terminalen Peptid von Tnlc gerichtet. Die Testführung kann sowohl sukzessiv, d. h. ein Antikörper wird zunächst mit der Probe inkubiert bevor der zweite Antikörper zugegeben wird, als auch simultan, d. h. alle Reaktionspartner werden im Test gleichzeitig zugegeben, erfolgen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist der kompetitive Test. Dabei wird ein vor oder während der Bestimmung immobilisierter Antikörper gegen das N-terminale Peptid von TnIc und ein Konjugat aus TnIc oder dem Antigen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und einer bestimmbarer Gruppe verwendet. Werden lediglich Teilsequenzen der Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 verwendet, so muß der verwendete Antikörper mit diesem Teil spezifisch bindenfähig sein.

Die kompetitive Testführung ist insbesondere bei homogenen Immunoassays geeignet. Bevorzugt ist der TINIA, der turbidimetrische Inhibierungs-Immunoassay. Eine Probe wird mit einem Polyhapten, das aus einem Mikropartikel, beispielsweise einem Latexpartikel oder Dextran und daran gebundenen N-terminalen TnI-Peptiden, besteht und den erfundungsgemäßen Antikörpern inkubiert. Es bilden sich Immunkomplexe aus Polyhaptenten oder TnIc und Antikörpern. Die Bindung der Antikörper an das Polyhapten führt zu Aggregaten, die durch Zunahme der Trübung gemessen werden können. Die Bindung von Antikörpern an den freien Analyten führt hingegen zu keinen größeren und damit Trübungsverursachenden Aggregaten, da die von den erfundungsgemäßen Antikörpern erkannten Epitope nur einmal auf dem Analyt vorkommen. Die Agglutination des Polyhaptents wird somit teilweise inhibiert. Der genaue Gehalt einer Probe an Analyt kann über eine Standardkurve bestimmt werden.

Geeignet ist auch ein homogener Immunoassay, bevorzugt ein CEDIA® (vergleiche Henderson et al., Clin. Chem. 32 (1986) 1637–1641). Das Peptidantigen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, wird an ED gekoppelt.

Unter einem Antikörper im Sinne der Erfundung ist ein kompletter Antikörper oder bi- oder monovalente Fragmente hiervon zu verstehen. Die Antikörper können sowohl monoklonal als auch polyklonal sein. Bevorzugt ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern, die das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennen. Das Verfahren besteht darin, daß man Versuchstiere, vorzugsweise Schafe, mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, in Kombination mit einem Adjuvans, über mehrere Monate (vorzugsweise 4–6 Monate) mindestens vier mal in vier- bis sechs-wöchigem Abstand immunisiert, Rohserum gewinnt und dieses mit dem Fachmann bekannten Methoden reinigt. Zur Immunoadsorption werden Adsorber verwendet, die ein Peptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 5 Aminosäuren Länge kovalent gebunden haben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfahrung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennen. Das Verfahren besteht darin, daß man Versuchstiere, vorzugsweise Inzucht-Mäuse, mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, in Kombination mit einem Adjuvans, über mehrere Monate mit mindestens vier Immunisierungen in vier- bis sechswöchigem Abstand intraperitoneal immunisiert. Milzzellen gewinnt und mit einer permanenten Myelom-Zelllinie fusioniert, die Klone isoliert und hieraus die Antikörper gewinnt.

Bevorzugt wird als Adjuvans Aluminiumhydroxid zusammen mit Bordetella pertussis oder Freund'schem Adjuvans eingesetzt. Das Immunogen, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, kann an ein Trägerprotein zur Erhöhung der Antigenität gekoppelt werden.

Die bei der Fusionierung nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495–497) gewonnenen Primär-Kulturen von Hybridzellen, werden in üblicher Weise, zum Beispiel unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters oder durch "limiting dilution" kloniert. Es werden jeweils die Kulturen weiterverarbeitet, die positiv gegenüber dem N-terminalen Peptid von kardialem Troponin I reagieren. Man erhält auf diese Weise Hybridoma-Zelllinien, die die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper produzieren. Nach bekannten Methoden können diese Zelllinien kultiviert und die von ihnen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Die erfundungsgemäßen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper eignen sich hervorragend dazu, in einer Probe, beispielsweise Serum oder Plasma, sehr schnell nach dem Infarkt-Ereignis Herzmuskelnekrosen spezifisch zu bestimmen. Für diese Bestimmungsverfahren können die Antikörper als solche oder Fragmente hiervon, welche die entsprechenden immunologischen Eigenschaften aufweisen, beispielsweise Fab-Fragmente verwendet werden. Unter dem Begriff Antikörper werden daher sowohl vollständige Antikörper als auch deren Fragmente verstanden.

Als Immunogen, Screeningreagenz bei der Auswahl der monoklonalen Antikörper, Standardmaterial im Immun assay und P lyhaptens beim TINIA-Test wird ein Antigen eingesetzt, das die Aminosäuresequenz

SEQ ID NO 1: MADGSSDAAREPRPAPAPIRRSSNYRAYA

oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält.

Als besonders geeignet haben sich die Antigene erwiesen, die die Aminosäuresequenzen

DE 42 43 648 A1

SEQ ID NO 2: MADGSSDAAR
 SEQ ID NO 3: SDAAREPRPA
 SEQ ID NO 4: EPRPAPAPIR
 SEQ ID NO 5: PAPIRRSSNY
 5 SEQ ID NO 6: MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNY
 SEQ ID NO 7: APAPIRRRSSNY
 SEQ ID NO 8: PAPIRRRSSNY

enthalten.

10 Die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 entspricht der 30 N-terminalen Aminosäuren des humanen cardialem TnI. Die Sequenz von humanem TnIc ist aus Vallins et al., FEBS Letters 270 (1990) 57–61 bekannt. Es war allerdings überraschend, daß durch die Verwendung von Antikörpern, die mittels Peptidimmunogenen hergestellt wurden, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthalten, Herzmuskelnekrosen schon kurz nach dem Infarktereignis nachgewiesen werden konnten. In einigen Fällen gelingt es, erhöhte Serumwerte mit dem erfundungsgemäßen Verfahren schon 30 bis 45 Minuten nach Beginn von Thoraxschmerzen mit Herzbeteiligung festzustellen. Mit den bisher üblichen Immunoassays konnten Herzmuskelnekrosen erst mit Sicherheit 10 Stunden nach dem Infarktereignis nachgewiesen werden. Mit dem erfundungsgemäßen Verfahren gelingt dieser Nachweis schon erheblich früher.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testkit zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen, der in einem Behältnis mindestens einen erfundungsgemäßen polyklonalen oder monokonalen Antikörper enthält. In mindestens einem weiteren Behältnis sind die übrigen zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens notwendigen Komponenten und Reagenzien, wie beispielsweise die Festphase, die mit Streptavidin beschichtet sein kann, weitere erfundungsgemäße Antikörper, die markiert sein können, Polyhaptene, Hilfsstoffe, wie Puffer oder Entstörreagenzien, enthalten.

20 25 Anhand der nachfolgenden Beispiele soll die Erfindung verdeutlicht werden:

Beispiel 1

Synthese von Peptiden zur Immunogensynthese am Beispiel
 30 H-Cys(-Acm)-εAca-Pro-Ala-Pro-Ile-Arg-Arg-Ser-Ser-Asn-Tyr-Amid (entspricht SEQ ID NO 8)

Das Peptid wurde an 180 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmocaminomethyl)-phenoxy Harz mit einer Beladung von 0.45 mMol/g synthetisiert. Die Sequenz wurde mit einer Kombination von Fmoc als temporärer und Pmc/tBu/Trt als permanente Schutzgruppen aufgebaut. Dazu wurden 16 Äquivalente folgender Aminosäure-Derivate verwendet:

40 Fmoc-Cys(-Acm)-OH
 Fmoc-ε-Aminocapronsäure
 2 x Fmoc-Pro-OH
 Fmoc-Ala-OH
 Fmoc-Ile-OH
 3 x Fmoc-Arg(-Pmc)-OH
 2 x Fmoc-Ser(-tBu)-OH
 Fmoc-Asn(-Trt)-OH
 45 Fmoc-Tyr(-tBu)-OH.

Die Kopplungsreaktionen erfolgten mit 1.1 Äquivalenten Diisopropylcarbodiimid/H-Hydrobenzotriazol in Bezug auf die Aminosäurederivate als Aktivierungsreagenzien. Die Kopplungszeiten betrugen 90 Minuten und wurden mit je 8 Äquivalenten Aminosäure-Derivaten zweimal durchgeführt. Die temporäre Schutzgruppe wurde mittels Piperidin innerhalb von 20 Minuten abgespalten. Die Reaktionen wurden in Dimethylformamid durchgeführt, für die Waschschrifte, die nach den Reaktionsschritten erfolgten, wurde das gleiche Lösungsmittel verwendet. Die Synthese wurde vollautomatisch an einem Zinsser SMPS 350 durchgeführt. Die Freisetzung des Peptides unter Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen, außer Acm, erfolgte mit einem Gemisch aus 95% Trifluoressigsäure, 3% Ethandithiol und 2% Anisol innerhalb von 90 Minuten. Die Abspaltlösung wurde abfiltriert, mit der 10fachen Menge Diisopropylether versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit Diisopropylether gewaschen, in 20-%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Es fielen 107 mg weißes Lyophilisat an. Die Reinheit wurde mittels HPLC kontrolliert (92% Area), die Identität mittels Massenspektroskopie (MH⁺: 1603) geprüft.

Abkürzungen:

60

65

DE 42 43 648 A1

Abkürzungen:

Fmoc-:	Fluorenylmethyloxycarbonyl-
-tBu:	tertiär Butyl-
Trt-:	Trityl-
Acm-:	Acetamidomethyl-
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Pmc-:	Pentamethylchroman-

5

10

Beispiel 2

Herstellung von Immunogenen

Synthese und Charakterisierung von Troponin I-Immunogenen

15

5 Peptidimmunogene, die die Aminosäuren 1–10, 6–15, 11–20, 16–26 und 1–30 des N-terminalen Troponin I umfassen, wurden unter Verwendung der folgenden Peptide hergestellt:

Peptid 1:

20

TropI, H(1–10) Cys(-Acm)-NH₂ (MADGSSDAARZC)
[Entspricht SEQ ID NO 2]

Peptid 2:

25

TropI, Cys(-Acm) 6–15-NH₂ (CZSDAAREPRPA)
[Entspricht SEQ ID NO 3]

Peptid 3:

30

TropI, Cys(-Acm) 11–20) NH₂ (CZEPRPAPAPIR)
[Entspricht SEQ ID NO 4]

Peptid 4:

35

TropI, Cys(-Acm) 16–26–NH₂ (CZPAPIRRSSNY)
[Entspricht SEQ ID NO 5]

Peptid 5:

TropI, H(1–30) Cys-NH₂ (MADGSSDAAREPRPAPAPIRRSSNYRAYAC)
[Entspricht SEQ ID NO 1]

C: Cys(-Acm)-OH

40

Z: ε-AHS-OH.

Die Synthese wird am Beispiel von TropI, H(1–10)Cys-NH₂ mit der Aminosäuresequenz MADGSS-DAARZC beschrieben.

Als Trägerprotein wird Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), das mit Maleimido-hexanoyl-N-hydroxysuccinimid aktiviert wurde (KLH-MH, Boehringer Mannheim Biochemica), verwendet.

Abspaltung der Acetamidomethyl- (Acm)-Schutzgruppe am Cystein

Alle Lösungen werden vor Gebrauch mit Argon gespült, da die Acm-Schutzgruppe unter Ausschluß von Sauerstoff abgespalten wird. 35,4 mg (28 μmol) des Peptids 1 werden in 20 ml 50-%iger Essigsäure (v/v, pH = 4) gelöst. Dazu gibt man 117 mg (0,7 mmol) Silberacetat und röhrt die Lösung unter Argon im Dunkeln für 20 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird für 15 Minuten Argongas eingeleitet, danach 30 Minuten lang H₂S (g). Das restliche H₂S-Gas wird durch nochmaliges Einleiten vor Argon (10 Minuten) ausgetrieben. Man zentrifugiert bei 4000 U/min den schwarzen Niederschlag ab und filtriert die Lösung über einen 0,45 μm Filter. Die Lösung wird 1 : 1 mit bidest. Wasser verdünnt und lyophilisiert. Die Freisetzung der SH-Gruppe wird durch Reversed-Phase-HPLC überprüft. Dazu wird das Peptid mit 6-Maleimidohexansäure derivatisiert, Acm-geschütztes und MH-derivatisiertes Peptid lassen sich dann aufgrund unterschiedlicher Retentionszeit auf der HPLC unterscheiden (Vydac C18, 5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 mm; 0–45% B in 30 Minuten; A: 0,1% TFA in H₂O; B: 0,1% TFA in Acetonitril/H₂O 65 : 35).

Eine Quantifizierung der Sulfhydrylgruppe wurde nach Ellman, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77 durchgeführt. Man erhielt 35 mg (97% d. Th.) ungeschütztes Peptid.

Konjugation an Maleimidohexan-yl aktiviertes KLH

65

Als Trägerprotein wird Maleimidohexan-yl aktiviertes Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH-MH, Boehringer Mannheim Biochemica) verwendet. Unmittelbar vor der Peptidkopplung wird die Proteinkonzentration durch BCA-Proteinbestimmung (Bicinchoninic acid, Pierce Company, Rockford, IL, USA) und der MH-Gehalt von

DE 42 43 648 A1

KLH-MH anhand des Ellman's Testes bestimmt. Zu 16,7 mg (5,4 nmol) KLH-MH mit einer Beladung von 547 MH-Gruppen pro Äquivalent KLH in 6,6 ml Phosphatpuffer (20 mM K₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 10 mM CaCl₂, 0,2% Saccharose, pH7) werden tropfenweise 10,5 mg (8,8 µmol) des entschlütteten Peptids in 3 ml Phosphatpuffer gegeben. Der pH-Wert wird mit verdünnter NaOH auf 6–7 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Zur Abtrennung des überschüssigen Peptids wird der Reaktionsansatz auf eine Gelfiltrationssäule geladen (AcA 202, 24 × 4 cm, IBF Biotechnics) und das Protein/Peptid-Konjugat mit oben erwähntem Phosphatpuffer eluiert.

Die Proteinkonzentration wird wiederum durch BCA bestimmt, die Peptidkopplungseffizienz mittels Ellman's Test. Man erhielt 14,8 mg (72% d. Th.) des Immunogens mit einer Beladung von 547 Peptid/KLH-MH.

Analog dieser Vorschrift wurden auch alle anderen Peptid-Immunogene hergestellt.

Beispiel 3

Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen ein Peptid der N-terminalen Sequenzen des Troponin I Proteins

Balb/c-Mäuse, 8–12 Wochen alt, wurden mit je 100 µg Peptid-Immunogenen aus dem Beispiel 2, mit komplettem Freund'schem Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Nach 6 Wochen wurden drei weitere Immunisierungen in 4wöchigem Abstand durchgeführt. Dabei wurden jeweils 50 µg Immunogen, an Aluminiumhydroxid und Bordetella pertussis adsorbiert, intraperitoneal verabreicht. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte eine Blutentnahme und die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum der Versuchstiere. Bei positivem Verlauf der Immunisierung wurde fusioniert. Vier Tage vor der Fusionierung wurde jeweils noch einmal mit 50 µg Immunogen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung intravenös immunisiert. In Anlehnung an Galfre, (Methods in Enzymology, 73 (1981) und Köhler, Milstein, Nature 256 (1975), s. 495–497) wurden 1×10^8 Milzzellen einer immunisierten Maus mit 2×10^7 Myelomzellen (P3x63Ag8-653, ATCC-CRL 8375) gemischt und mit PEG-Lösung fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in 24well-Platten ausplattiert und in Selektionsmedium kultiviert. Nach 7–10 Tagen, wenn Klonwachstum sichtbar war, wurde der Kulturüberstand der Primärkulturen auf Spezifität im ELISA-Verfahren getestet. Die Primärkulturen, die antigen-spezifische Antikörper enthielten, gehen mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierenden Zellsorters (FACS) in die Einzelzellablage. Die erhaltenen Klone wurden kultiviert und auf Spezifität im ELISA-Verfahren getestet. Aus positiven Klonen wurden Hybridoma-Zelllinien etabliert und größere Mengen an Antikörpern, mittels Zellfermenter beziehungsweise Aszitesproduktion hergestellt.

Für die Bestimmung der Spezifität der Antikörper wurde ein ELISA-Verfahren als Testprinzip verwendet. Mikrotiterplatten (Firma Nunc) wurden mit T-RSA (thermisch aggregiertes RSA) beschichtet und mit 1 µg/ml biotinyliertem Peptid beladen. Nach einem Waschschritt erfolgte die Inkubation der Antikörperprobe. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte die Inkubation des Nachweisantikörpers, mit polyclonalem Schaf-anti-Maus-Fcg, Fab-Peroxidase-Konjugat. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Peroxidaseaktivität mit Farbsubstrat (ABTS) bestimmt.

Beispiel 4

Synthese von Peptiden als Teststandards

Synthese von

H-Met-Ala-Asp-Gly- \downarrow Ser-Ser- \downarrow Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Pro-Arg-Pro-Ala-Pro-Ile-Arg-Arg-Ser-Ser-Asn-Tyr-Amid (entspricht SEQ ID NO 6)

Das Peptid wurde an 120 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmocaminomethyl)-phenoxy Harz mit einer Beladung von 0,45 mMol/g synthetisiert. Die Sequenz wurde mit einer Kombination von Fmoc als temporärer und Pmc/tBu/Trt/OtBu als permanente Schutzgruppen aufgebaut. Dazu wurden 16 Äquivalente folgender Fmoc-Aminosäure-Derivate verwendet:

Met
5 × Ala
55 2 × Asp(-OtBu)
Gly
4 × Ser(tBu)
5 × Arg(-Pmc)
Glu(OtBu)
60 4 × Pro
Ile
Asn(-Trt)
Tyr(-tBu)

65 Die Kopplungsreaktionen erfolgten mit 1,1 Äquivalenten Diisopropylcarbodiimid/N-Hydrobenzotriazol in Bezug auf die Aminosäurederivate als Aktivierungsreagenzien. Die Kopplungszeiten betragen 90 Minuten und wurden mit je 8 Äquivalenten Aminosäure-Derivat zweimal durchgeführt. Die temporäre Schutzgruppe wurde mittels Piperidin innerhalb von 30 Minuten abgespalten. Die Reaktionen wurden in Dimethylformamid durchge-

DE 42 43 648 A1

führt, für die Waschschritte, die nach den Reaktionsschritten erfolgten, wurde das gleiche Lösungsmittel verwendet. Die Synthese wurde vollautomatisch an einem Zinsser SMPS 350 durchgeführt. Die Freisetzung des Peptides unter Abspaltung der SeitenkettenSchutzgruppen erfolgte mit einem Gemisch aus 95% Trifluoressigsäure, 3% Ethandithiol und 2% Anisol innerhalb von 90 Minuten. Die Abspaltlösung wurde abfiltriert, mit der 10fachen Menge Diisopropylether versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit Diisopropylether gewaschen, in 20%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Es fielen 29.5 mg weißes Lyophilisat an. Die Reinheit wurde mittels HPLC kontrolliert (60 % Area). Das Rohpeptid wurde über eine 20 mm x 300 mm RP-HPLC-Säule (Saulenmaterial: C-18, 5 µ, 300 Å) mit einem Gradientensystem von 0% B auf 100% B in 100 Minuten (Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser, Puffer B: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser/Acetonitril 40 : 60) auf eine Reinheit lt HPLC von 97% gereinigt.

Nach Vereinigung der Hauptfraktionen, Eindampfen im Wasserstrahlvakuum auf 30% und Lyophilisation wurden 9.75 mg weißes Lyophilisat erhalten. Die Identität wurde mittels Massenspektroskopie (MH⁺: 2827) geprüft.

Abkürzungen

Fmoc-:	Fluorenylmethyloxycarbonyl-
-tBu:	tertiär Butyl-
-Trt:	Trityl-
-OtBu:	tertiär Butylester
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Pmc-:	Pentamethylchroman-
Boc-:	tertiär Butyloxycarbonyl.

Beispiel 5

Synthese von biotinylierten Peptiden als Screeningreagenzien

Synthese von H-Lys(-Bi)-βAla-εAca-βAla-Ala-Pro-Ala-Pro-Ile-Arg-Arg-Gly-Ser-Ser-Asu-lTyr-lAmid
(entspricht SEQ ID NO 7)

Das Peptid wurde an 30 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmocaminomethyl)-phenoxy Harz mit einer Beladung von 0.45 mMol/g synthetisiert. Die Sequenz wurde mit einer Kombination von Fmoc als temporärer und Pmc/tBu/Trt/DmTr/Boc als permanente Schutzgruppen aufgebaut. Dazu wurden 16 Äquivalente folgender Fmoc-Aminosäure-Derivate verwendet:

DmTR-Biotin
Boc-Lys(-Fmoc)-OH
2 x Fmoc-βAla-OH
Fmoc-ε-Aminocapronsäure
2 x Fmoc-Ala-OH
2 x Fmoc-Pro-OH
Fmoc-Ile-OH
3 x Fmoc-Arg(-Pc)-OH
2 x Fmoc-Ser(-tBu)-OH
Fmoc-lAsn(-Trt)-OH
Fmoc-Tyr(-tBu)-OH.

Die Kopplungsreaktionen erfolgten mit 1.1 Äquivalenten Diisopropylcarbodiimid/N-Hydrobenzotriazol in Bezug auf die Aminosäurederivate als Aktivierungsreagenzien. Die Kopplungszeiten betrugen 90 Minuten und wurden mit je 8 Äquivalenten Aminosäure-Derivat zweimal durchgeführt. Die temporäre Schutzgruppe wurde mittels Piperidin innerhalb von 20 Minuten abgespalten. Die Reaktionen wurden in Dimethylformamid durchgeführt, für die Waschschritte, die nach den Reaktionsschritten erfolgten, wurde das gleiche Lösungsmittel verwendet. Die Synthese wurde vollautomatisch an einem Zinsser SMPS 350 durchgeführt. Die Freisetzung des Peptides unter Abspaltung der SeitenkettenSchutzgruppen erfolgte mit einem Gemisch aus 95% Trifluoressigsäure, 3% Ethandithiol und 2% Anisol innerhalb von 90 Minuten. Die Abspaltlösung wurde abfiltriert, mit der 10fachen Menge Diisopropylether versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit Diisopropylether gewaschen, in 20%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Es fielen 22.5 mg weißes Lyophilisat an. Die Reinheit wurde mittels HPLC kontrolliert (82 % Area), die Identität wurde mittels Massenspektroskopie (MH⁺: 1996) geprüft.

5

10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 42 43 648 A1

Abkürzungen

Fm c-:	Fluorenylmethyloxycarbonyl-
-tBU:	tertiär Butyl-
5 -Trt:	Trityl-
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
DmTr:	Dimethoxyltrityl
Boc-:	tertiär Butyloxycarbonyl

10

SEQUENZPROTOKOLL

15 (iii) Anzahl der Sequenzen: 8

(2) Information zu SEQ ID NO: 1:

20

(i) Sequenz Charakteristika

25

- (A) Länge: 30 Aminosäuren
- (B) Art: Peptid
- (C) Topologie: linear

30

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala

35

1 5 10 15

Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala

40

16 20 25 30

45

(2) Information zu SEQ ID NO: 2:

50

(i) Sequenz Charakteristika

55

- (A) Länge: 10 Aminosäuren
- (B) Art: Peptid
- (C) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

60

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg

1 5 10

65

DE 42 43 648 A1

(2) Information zu SEQ ID NO: 3:

(i) Sequenz Charakteristika

5

(A) Länge: 10 Aminosäuren

(B) Art: Peptid

(C) Topologie: linear

10

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

15

Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala

1

5

10

20

(2) Information zu SEQ ID NO: 4:

25

(i) Sequenz Charakteristika

(A) Länge: 10 Aminosäuren

30

(B) Art: Peptid

(C) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

35

Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg

1

5

10

40

45

50

55

60

65

DE 42 43 648 A1

(2) Information zu SEQ ID NO: 5:

5 (i) Sequenz Charakteristika

(A) Länge: 11 Aminosäuren

(B) Art: Peptid

10 (C) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

15

Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr

1

5

10

20

(2) Information zu SEQ ID NO: 6:

25

(i) Sequenz Charakteristika

(A) Länge: 26 Aminosäuren

30

(B) Art: Peptid

(C) Topologie: linear

35

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

40

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala

1

5

10

15

45

Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr

16

20

25

50

55

60

65

DE 42 43 648 A1

(2) Information zu SEQ ID NO: 7:

(i) Sequenz Charakteristika

(A) Länge: 12 Aminosäuren

5

(B) Art: Peptid

(C) Topologie: linear

10

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

15

Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr

1 5 10

20

(2) Information zu SEQ ID NO: 8:

25

(i) Sequenz Charakteristika

(A) Länge: 11 Aminosäuren

30

(B) Art: Peptid

(C) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

35

Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr

1 5 10

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung von Herzmuskelnekrosen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe mit mindestens einem Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und Isolierung des polykonalen oder monokonalen Antikörpers aus dem Serum bzw. den immortalisierten und klonierten Milzzellen der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren, versetzt und den sich bildenden Komplex in geeigneter Weise nachweist.

45

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Immunogen eine der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO 2—8 enthält.

50

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die immunologische Bestimmung nach dem Prinzip eines Sandwich-Assays erfolgt.

55

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die immunologische Bestimmung nach dem Prinzip eines kompetitiven Immunoassays erfolgt.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die immunologische Bestimmung nach dem Prinzip eines homogenen Immunoassays, wie beispielsweise einem CEDIA® erfolgt.

60

6. Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren.

7. Monoklonaler Antikörper, der das N-terminale Peptid von kardialem Troponin I erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem Immunogen, das die Sequenz SEQ ID NO 1 oder Teilsequenzen davon mit mindestens 6 Aminosäuren Länge enthält, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren und Isolierung des Antikörpers aus den klonierten Zellen nach bekannten Verfahren.

65

DE 42 43 648 A1

8. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 4 oder 5 zur immunologischen Bestimmung von Herzmuskelnekrosen.

9. Verwendung eines Immunogens, das die Amin säuresequenz SEQ ID NO 1 der eine Teilsequenz davon mit mindestens 6 Amin säuren Länge enthält zur Herstellung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, als Standardmaterial bei Immunoassays oder als Polypeptiden in kompetitiven Immunoassays.

10. Testkit zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Behältnis mindestens ein Antikörper gemäß einem der Ansprüche 6 oder 7 und in mindestens einem weiteren Behältnis die übrigen für den Immunoassay notwendigen Komponenten enthalten sind.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65